Experimentelle Untersuchungen über den Einfluß von Gallensäuren auf die Fettsäuresynthese in vitro

MORTEZA SCHARIFZADEH

1967

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546019_0077

Dissertations- und Fotodruck Franz Frank
8 München 13, Zieblandstr. 39, Tel. 597 397

Aus der medizinischen Poliklinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. W. Seitz

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS VON GALLENSÄUREN AUF DIE FETTSÄURESYNTHESE IN VITRO

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin verfaßt
und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Morteza Scharifzadeh
aus Teheran / Iran

München 1967

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Herr Prof. W. Seitz
Dekan:	Herr Prof. Holle
Tag der mündlichen Prüfung:	12. 12. 1967

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

Verdauung und Resorption der Fette

Der Fettsäureabbau

Die Fettsäuresynthese

2. PROBLEMSTELLUNG

3. EXPERIMENTELLER TEIL

Darstellung des verwendeten Enzymsystems

Inkubation

Isolierung der synthetisierten Fettsäuren

Messung der synthetisierten Fettsäuren

Zeitkurven

4. ERGEBNISSE

5. ZUSAMMENFASSUNG

6. LITERATUR

7. LEBENSLAUF

EINLEITUNG

Die Fette sind zusammengesetzte Verbindungen, die sich leicht in kleinere Moleküle aufspalten lassen. Die Fette spielen in der menschlichen Ernährung (und in der Ernährung vieler Tiere) eine große Rolle, sie stellen eine sehr kalorienreiche Nahrung dar. Die eigentliche biologische Bedeutung der Fette liegt jedoch darin, daß sie als Reservestoffe dienen. Über den Normalbedarf hinaus aufgenommene Nahrungsstoffe werden großenteils in Fett verwandelt und in geeigneten Geweben abgelagert. Sie werden in Zeiten des Nahrungsmangels wieder abgebaut. Dabei ist das Leberfett in viel rascherem Umsatz begriffen als das der Fettgewebe. Die biologischen Halbwertzeiten betragen bei der Ratte 1-2 Tage für Leberfett, 15-20 Tage für Depotfett. Daneben finden sich Fette als Strukturbestandteile bestimmter Gewebe und - allerdings in kleinen Mengen, neben den wichtigeren Lipoiden (Phosphatiden, Sterinen u. a. m.) - in den meisten membranartigen Strukturen. Sie sind am Aufbau der Protein-Lipid - Doppelschichten beteiligt. Die natürlich vorkommenden Fette bestehen nahezu ausschließlich aus Glyceriden. Die Angaben über das Vorkommen von Mono- und Diglyceriden in der Natur sind spärlich und unsicher. Neuerdings konnte aus dem Pankreas ein -Mono-Palmitin isoliert werden. Bei der Fettverdauung im Darm entstehen neben Diglyceriden ebenfalls Monoglyceride. Diglyceride sind eine Durchgangsstufe der biologischen Fettsynthese. In den Fetten kommen zahlreiche verschiedene Fettsäuren vor, gesättigte und ungesättigte, geradkettige und verzweigtkettige, solche mit gerader und ungerader Zahl von C-Atomen und schließlich auch Hydroxy- und Ketosäuren. Es ist zu betonen, daß die Fettsäuren aus den natürlich vorkommenden Fetten weit überwiegend eine unverzweigte Kette und eine gerade Zahl von C-Atomen aufweisen. Es mehren sich jedoch die Befunde, wo in normalen Fetten ziemlich regelmäßig, wenn auch nur in sehr geringer Menge ungeradzahlige Fettsäuren vorkommen. Es konnten in den Fetten alle Fettsäuren mit 1-19 C-Atomen nachgewiesen werden. Die Säuren, die in den natürlichen Fetten vorkommen, besitzen stets eine gerade Anzahl von Kohlenstoffatomen.
Das ist uns heute verständlich, seit wir wissen, daß sie aus C2 Einheiten, nämlich Essigsäureestern aufgebaut werden.

Weniger leicht erklärlich ist, daß die Säuren mit 16 und 18 Kohlenstoffatomen bevorzugt sind, die Palmitinsäure $C_{16}H_{32}O_2$ und die Stearinsäure $C_{18}H_{36}O_2$. Ungesättigte Fettsäuren sind neben den gesättigten vielfach anzutreffen, vor allem solche, die ihre Doppelbindung zwischen den C-Atomen 9 und 10 haben (Carboxyl-Kohlenstoffatome tragen die Nummer 1). Die Ölsäure oder Öleinsäure ist dadurch beinahe symmetrisch, die Doppelbindung liegt in der Mitte der Kohlenstoffkette. Eine Doppelbindung bedingt das Auftreten räumlicher Isomerie, die Substituenten können in cis oder trans-Anordnung an den durch die Doppelbindung verknüpften C-Atomen stehen. Die Ölsäure ist eine cis-Form, die trans-Form kann daraus durch chemische Umlagerungsreaktionen entstehen. Letztere erhielt den Namen Elaidinsäure. Höher ungesättigte Säuren sind die Linolsäure, Linolensäure und Arachidonsäure. Es sind "isolierte" Säuren, wie der Chemiker sagt. Doppelbindungen, die nur durch eine Einfachbindung getrennt sind, können nämlich in Wechselwirkung treten, wie sich u. a. durch die Absorption in ultraviolettem Licht kundtut. Die höher ungesättigten Fettsäuren finden sich besonders reichlich in pflanzlichen Ölen. Manche Säugetiere, z.B. Ratten, können sie nicht selbst synthetisieren, sie sind dann essentielle Nahrungsbestandteile. Die mehrfach ungesättigten Fettsäuren werden auch als "Vitamin F" bezeichnet. Ihre Bedeutung für den Menschen ist noch nicht klar, man hat noch keine Mangelerscheinungen beobachtet, die eindeutig auf das Fehlen essentieller Fettsäuren zurückzuführen sind. Die Fette, die viel gesättigte Säuren enthalten (es liegen ja stets Mischungen vor), haben einen höheren Schmelzpunkt, sie sind bei Zimmertemperatur fest, während diejenigen mit viel ungesättigten Fettsäuren flüssig oder ölig sind ("Öl" bezeichnet eine Konsistenz, keine chemische Struktur!). Man kann die ungesättigte Verbindung hydrieren, d. h. an die Doppelbindungen katalytisch Wasserstoff anlagern. Da bei Fetten dadurch der Schmelzpunkt erhöht wird, so daß vorher ölige Fette bei Zimmertemperatur fest werden, nennt man das "Fetthärtung". Sie spielt bei der Margarineproduktion und damit auch für die Ernährung des Menschen eine erhebliche Rolle.

Verdauung und Resorption der Fette

Ehe die mit der Nahrung zugeführten Fette zur Resorption gelangen, unterliegen sie einem Verdauungsvorgang. Dieser Prozeß spielt sich vorwiegend im Dünndarm ab

und besteht teils in einer Überführung der Fette in feinste Verteilung, teils in ihrer chemischen Zerlegung, wobei wasserlösliche Verbindungen entstehen. Eine Vielzahl von Faktoren wirken bei diesen Vorgängen mit. Sie können unter zwei Gesichtspunkten zusammengefaßt werden: die Hydrolyse und die Emulgierung.

1) Die Hydrolyse erfolgt mit Hilfe von Lipasen, und zwar handelt es sich um eine Enzymgruppe mit geringer Spezifität. Lipasen werden in ihrer Wirkung durch Begleitstoffe stark beeinflußt. Der hydrolytische Effekt der Lipasen ist um so größer, je feiner verteilt ihr wasserunlösliches Substrat ist. Dementsprechend findet man, daß Eiweiße und Gallensäuren, die eine Emulgierung der Fette bewirken, die Aktivität fördern. Darüber hinaus zeigt auch Calcium einen aktivierenden Einfluß. Schon im Magensaft findet sich eine Lipase, die allerdings erst im Duodenum zur vollen Wirkung gelangt. Die hydrolytische Spaltung durch Lipasen ist keineswegs vollständig. Vermutlich wird ein großer Teil der Fette in Form von wasserlöslichen Monoglyceriden resorbiert.
Neben den eigentlichen Lipasen sind im Pankreassaft auch Phospholipasen und andere esterspaltende Enzyme gefunden worden.

2) Die Emulgierung ist für die Verdauung der Fette von entscheidender Bedeutung, da sie sowohl die Lipasewirkung fördert als auch die unmittelbare Resorption feinster Lipidteilchen ermöglicht. Die Emulgierung erfolgt im Wesentlichen durch das Zusammenspiel von Gallensäuren und Monoglyceriden mit den Triglyceriden bzw. Fettsäuren. Es entstehen dabei Micellen, die in ihrem Inneren die hydrophoben Fettsäuren einschließen. Darüber hinaus spielt möglicherweise auch die Bildung von Choleinsäuren eine Rolle. Von besonderer Bedeutung ist die Tatsache, daß feinstemulgierte Teilchen in der Größe zwischen 0,1 und 0,5 mu direkt ohne Hydrolyse aufgenommen werden können. Es konnte gezeigt werden, daß auf diese Weise sogar Paraffinöl resorbiert wird. Dieser Vorgang erfolgt anscheinend durch die PINOZYTOSE, bei der das endoplasmatische Retikulum eine besondere Rolle spielt (LEWIS, HOLTER).
Bleibt die Emulgierung aus, etwa beim Gallengangverschluß, so führt das zu einer schweren Beeinträchtigung der Fettverdauung und -resorption, was von großem klinischen Interesse ist. Die Untersuchung der Fettverdauung und -resorption mit Hilfe radioaktiv markierter Fette hat sich als einfache und zuverlässige Beurteilungs-

methode der Fettresorption erwiesen (CHANDLER).
K. LANG machte im Jahre 1953 klar, daß alle bisher üblichen Vorstellungen von der Resorption der Fette unhaltbar geworden sind.
Die Spaltung der Fette in Glycerin und Fettsäuren erfolgt im Magen-Darmkanal bei weitem nicht quantitativ.
Die Resorption in der Darmwand beruht auf einer aktiven Zell-Leistung, die durch Sauerstoffmangel und Narkose gehemmt wird. Der Weitertransport der höheren Fettsäuren erfolgt ausschließlich mit der Lymphe.

Die Vorgänge in der Darmmucosa

In den Mucosazellen spielen sich sowohl abbauende als auch synthetisierende Vorgänge ab. Dabei kann eine Resynthese von Triglyceriden und eine Bildung von Phosphatiden nachgewiesen werden. Niedrige Fettsäuren und resorbiertes Glycerin scheinen ohne wesentliche Veränderungen der Darmmucosa durch das Kapillarblut transportiert zu werden. Der überwiegende Teil der Triglyceride und Phosphatide sowie auch ein gewisser Anteil der freien Fettsäuren wird aber auf dem Lymphwege transportiert. Daher kommt es bei Störungen des Lymphabflusses oder bei einer Fistel zu einer weitgehenden Beeinträchtigung der Fettaufnahme, aber auch des Kreislaufes der Gallensäuren.

Der Fettsäureabbau

Auf Grund seiner klassischen Experimente stellte KNOOP im Jahre 1905 seine Theorie der ß-Oxydation auf, wonach die Kohlenstoffketten der Fettsäuren beim Abbau um jeweils zwei Glieder verkürzt werden, so daß alle geradzahligen Fettsäuren als Intermediärprodukte entstehen. Wenn auch die Richtigkeit der Vermutung von KNOOP von vielen Nachuntersuchern in den verschiedensten Versuchsanordnungen immer wieder bestätigt wurde, so konnte der endgültige Beweis doch erst in der neueren Zeit mit Hilfe der Isotopentechnik, vor allem durch SCHÖNHEIMER und RITTENBERG, erbracht werden. Auch die Aufklärung des höheren Mechanismus der ß-Oxydation ließ lange Zeit auf sich warten, da es nicht gelang, die vermuteten Zwischenprodukte zu fassen. Um das zu erreichen, war es nötig, die Versuchssysteme immer mehr spezifisch zu gestalten. Die erste Vereinfachung brachte EMBDEN, der

seine Versuche an durchströmten Lebern durchführte. Ein bedeutender Schritt vorwärts waren dann die Versuche von LELIOR und MUNOZ, die den Abbau der Fettsäuren in Leberhomogenaten und später in zellfreien Enzymsystemen erforschten. Später konnte dann gezeigt werden, daß die Enzyme des Fettsäureabbaus in den Mitochondrien konzentriert sind. Damit wurde gleichzeitig der enge Zusammenhang zwischen Fettsäureoxydation, Zitronensäurecyklus und der oxydativen Phosphorylierung erkannt, und es stellte sich heraus, daß der Oxydation eine Aktivierung der Fettsäuren vorangehen mußte.

Nach der Entdeckung des Coenzym-A durch NACHMANSON und LIPMANN wies dann LYNEN nach, daß die Aktivierung der Fettsäuren durch Bindung an das Coenzym-A erfolgt, daß das C_2-Bruchstück KNOOPs identisch mit aktivierter Essigsäure ist. Die KNOOPsche Formulierung der ß-Oxydation konnte also beibehalten werden, wenn man die freien Fettsäuren durch ihre Coenzym-A Dreivate ersetzte. Die Bindung der Fettsäuren an das Coenzym-A besorgen die Thiokinasen mit Hilfe von ATP. Es sind drei verschiedene Enzyme dieser Art bekannt.

1) Die Essigsäure-Thiokinase, die bei Essigsäure und Propionsäure aktiv ist,

2) eine Fettsäure-Thiokinase, die bei Kettenlängen von C_4 bis C_{12} wirksam ist,

3) eine für langkettige Fettsäuren spezifische Thiokinase.

In jedem Fall sind für die Thiokinasereaktion Mg^{++} Ionen erforderlich, was darauf zurückgeführt wird, daß das Magnesium an das Enzym gebunden wird und so mit dem ATP und CoASH eine Chelatbindung eingeht, in der dann die Fettsäure auf das CoASH übertragen wird:

$$R\text{-}(CH_2)n\text{-}COOH + CoASH + ATP \xrightarrow[\text{Thiokinase}]{Mg^{++}} R\text{-}(CH_2)n\text{-}COSCoA + AMP + PP.$$

Die so aktivierten Säuren werden dann in einer Folge von Teilprozessen um eine C_2-Einheit verkürzt. In der ersten Reaktion werden sie durch eine Dehydrogenase dehydriert:

$$R\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}COSCoA \xrightarrow{\text{Acyldehydrogenase}} R\text{-}CH = CH - COSCoA.$$

Es entstehen die entsprechenden -ß-ungesättigten Fettsäure-CoA-Verbindungen, vermutlich in trans-Stellung, da diese für die weiteren enzymatischen Reaktionen

Voraussetzung ist. Auch hier werden drei Enzyme mit verschiedener Kettenlängenspezifität isoliert. Das G-Enzym (green flavoprotein) ist spezifisch für kurzkettige Acyl-CoA-Verbindungen von C_4-C_8, Y_1 (yellow flavoprotein) für mittlere Kettenlängen von C_8-C_{12} und Y_2 für längere Kettenlängen. Es wird demnach der erste oxydative Schritt des Fettsäureabbaus von einer Reihe von Enzymen gesteuert, von denen jedes einzelne das Ausmaß des Abbaues bestimmen kann. Die drei Acylhydrogenasen sind Flavoproteine mit Flavin-adenin-nucleotid als prothetischer Gruppe. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, daß die reduzierten Acylhydrogenasen nicht durch einen herkömmlichen Elektronenakzeptor oxydiert werden, sondern vermittels eines anderen Flavoprotein, des sogenannten electron transferring falvoprotein (ETF), an das sie wahrscheinlich locker gebunden sind. Im weiteren Verlauf des Fettsäureabbaus wird an die CoA-Verbindung der -ß-ungesättigten Säure durch das Enzym Crotonase ein Molekül Wasser angelagert, wobei ein L(+)-ß-oxyacyl-CoA entsteht:

$$R\text{-}CH = CH\text{-}CO\ SCoA + H_2O \xrightarrow{\text{Crotonase}} R\text{-}CHOH\text{-}CH_2\text{-}CO\ SCoA$$

Bei der Crotonase konnte keine Spezifität für bestimmte Kettenlängen gefunden werden, sondern es werden alle -ß-Acyl-CoA-Ester von C_{14}-C_{18} in gleicher Weise von demselben Enzym umgesetzt.

Aus den trans-isomeren Formen des -ß-ungesättigten Derivates werden die ß-oxy-Acyl-CoA-Verbindungen der L-serien gebildet, aus den cis-isomeren Formen dagegen entstehen die Formen der D-Serien. Außerdem vermag die Crotonase auch noch ß- -ungesättigtes Acyl-CoA zu dem entsprechenden ß-Oxy-Acyl-CoA zu hydrieren, so daß drei Formen im Gleichgewicht stehen:

1) Das -ß-ungesättigte Acyl-CoA, 2) das ß- -ungesättigte Acyl-CoA, und 3) das L(+)-ß-hydroxy-Acyl-CoA. Die nun entstandene sekundäre Alkoholgruppe wird im weiteren Verlauf des Abbaues zu Ketogruppe hydriert. Die Überführung in das ß-Ketoderivat wird von der ß-Hydroxyacyl-Dehydrogenase katalysiert. Das Enzym ist streng stereospezifisch für die ß-hydroxyacyl-CoA-Verbindungen der L-Serie, es überträgt den Wasserstoff auf DPN^+:

$$R\text{-}CHOH\text{-}CH_2\text{-}CO\ SCoA + DPN^+ \longrightarrow R\text{-}CO\text{-}CH_2\text{-}CO\ SCoA + DPNH + H^+$$

Das Enzym ist nicht kettenlängenspezifisch, es werden die CoA-Derivate aller ß-Hydroxysäuren von C_4-C_{17} umgesetzt. Beim nun folgenden letzten Schritt wird ein

weiteres Molekül CoASH thioklastisch gespalten. Es entsteht als Spaltstück die Acetyl-CoA-Verbindung, die aktivierte Essigsäure k. Diesen entscheidenden Schritt, die Abspaltung der C_2-Einheit besorgt die ß-Ketothiolase.
Eine eindeutige Kettenlängenspezifität ist bei der ß-Ketothiolase nicht festgestellt worden.
Die nun um 2 C-Atome verkürzte Acyl-CoA-Verbindung durchläuft dann aufs Neue die obige Reaktionsfolge. Da das Restmolekül nun aber bereits an CoA gebunden ist, bedarf es nicht mehr der erneuten Aktivierung durch die Thiokinasereaktion, sondern es kann unmittelbar in die Dehydrogenasereaktion eintreten. Es ist also für den vollständigen Abbau einer langkettigen Fettsäure nur 1 ATP nötig, damit die Fettsäureoxydationsspirale oder der "Fettsäurecyklus" durchlaufen werden kann.
Ist ein Molekül Fettsäure erst einmal in den Fettsäurecyklus gelangt, so wird es bis zum Acetyl-CoA abgebaut.

Die Fettsäuresynthese

Die bekannte Tatsache, daß sich der tierische Organismus aus anderen Stoffen vor allem Kohlenhydraten, Fette zu bilden vermag, hat erst ziemlich spät ihre wissenschaftliche Aufklärung erfahren; denn es gelang erst mit Hilfe der Isotopentechnik, Einblick in die Stoffwechselvorgänge der Biosynthese der Fettsäuren zu gewinnen.

Der biologische Abbau der Fettsäuren setzt an "aktivierten Säuren", d. h. von S-Acylverbindungen des Coenzym A ein. Im Verlauf von 4 Reaktionsstufen werden 4 Wasserstoffatome freigesetzt und die Kohlenstoffkette durch Abspaltung eines Moleküls Acetyl-CoA um eine C_2-Einheit verkürzt. Durch wiederholtes Durchlaufen dieses Kreisprozesses ist ein vollständiger Abbau des Fettsäuremoleküls zu Acetyl-CoA möglich (vergl. Fettsäurespirale).
Die klassischen Untersuchungen von SCHÖNHEIMER, SONDERHOFF, RITTENBERG und BLOCH führten zur Charakterisierung der Essigsäure als Baustein der Fettsäuren. Aufgrund dieses Befundes hat man die FETTSÄURESYNTHESE als einfache Umkehr des oben diskutierten Abbauweges gedeutet. Diese Annahme wurde zunächst durch LYNEN und seine Schule experimentell gestützt. Mit einem künstlich zusammengestellten Enzymsystem ließ sich Capronyl-CoA (C_6) mit Acetyl-CoA um 4 bis 6 Kohlenstoffatome verlängern und damit die Umkehr der beim Fettsäureabbau eingeschla-

genen Reaktionsfolge demonstrieren.

1956 erkannten KLEIN und WAKIL die Kohlensäure als wichtigen Cofaktor der Fettsäuresynthese. Dieser Befund ließ auf einen weit komplizierteren Mechanismus des Fettsäureaufbaues schließen. Das Studium der Synthese von Palmityl-CoA aus Acetyl-CoA an gereinigten Enzympräparaten führte zur Aufstellung folgender Bilanzgleichung für den synthetischen Prozeß (Gl. 1):

1) $8\ \text{Acetyl-CoA} + 14\ \text{TPNH} + 14\text{H}^+ + 7\text{ATP} \xrightarrow{\text{Mn}^{++},\ \text{HCO}_3^-}$

$\text{Palmityl-CoA} + 7\ \text{ADP} + 7\ \text{P} + 14\ \text{TPN}^+ + 7\ \text{CoA-SH}$

Demnach fungiert reduziertes Triphosphopyridinnucleotid (TPNH) als Wasserstoffdonator, außerdem wird mit der Spaltung von 7 Molekülen Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat (P) ein zusätzlicher Energiebetrag von rund 50 Kal für den synthetischen Prozeß bereitgestellt. Mn^{++}-Ionen und die Kohlensäure (HCO_3^-) übernehmen nur eine katalytische Funktion. Die Rolle der Kohlensäure, des ATP und der Mn^{++}-Ionen fand mit dem Nachweis von Malonyl-CoA al s Zwischenprodukt der Fettsäuresynthese ihre Aufklärung. Malonyl-CoA entsteht durch Carboxylierung von Acetyl-CoA. Der erforderliche Energiebedarf wird durch die Spaltung des Adenosintriphosphats gedeckt. Enzymgebundenes Biotin überträgt die Kohlensäure (Gl. 2 und 3).

2) $\text{Biotin-Enzym} + \text{ATP} + \text{CO}_2 \xrightarrow{\text{Mn}^{++}} \text{CO}_2\text{-Biotin-Enzym} + \text{ADP} + \text{P}$

3) $\text{CO}_2\text{-Biotin-Enzym} + \text{Acetyl-CoA} \longrightarrow \text{Malonyl-CoA} + \text{Biotin-Enzym}$

Die Überführung des Malonyl-CoA in höhere Fettsäuren wird durch einen Enzymkomplex katalysiert, der als Fettsäuresynthese bezeichnet wurde und in tierischen, pflanzlichen und bakteriellen Systemen weit verbreitet ist. Acetyl-CoA dient dabei als Starter des Syntheseprozesses. Seine beiden Kohlenstoffatome finden sich im Methylende der synthetisierten Fettsäure, das somit durch sukzessive Anlagerung von C_2-Einheiten aus Malonyl-CoA aufgebaut wird. Der detaillierte Mechanismus dieses Prozesses wurde durch LYNEN und Mitarbeiter an einem aus Hefe isolierten Enzympräparat aufgeklärt. Danach beginnt der synthetische Prozeß mit einer Über-

tragung der Säurereste vom Coenzym A auf eine zentrale und eine periphere SH-Gruppe des Synthetasekomplexes. Der Aufbau der Fettsäure erfolgt dann in einer Folge enzymgebundener Reaktionen, wie sie im umseitig wiedergegebenen Schema dargestellt sind. Die einzelnen Reaktionsfortschritte sind:

1) Bildung eines S-Malonyl- und S-Acetyl-Enzym durch Übertragung der Säurereste auf eine zentrale bzw. periphere SH-Gruppe des Enzymkomplexes.

2) Übertragung des Acetylrestes auf das -Kohlenstoffatom des S-Malonyl-Enzymes. Unter gleichzeitiger Decarboxylierung entsteht ein S-Acetacetyl-Enzym. Der Säurerest ist an die zentrale SH-Gruppe des Enzymkomplexes gebunden.

3) Hydrierung des Acetacetylthioesters mit TPNH unter Bildung eines ß-Hydroxythioesters.

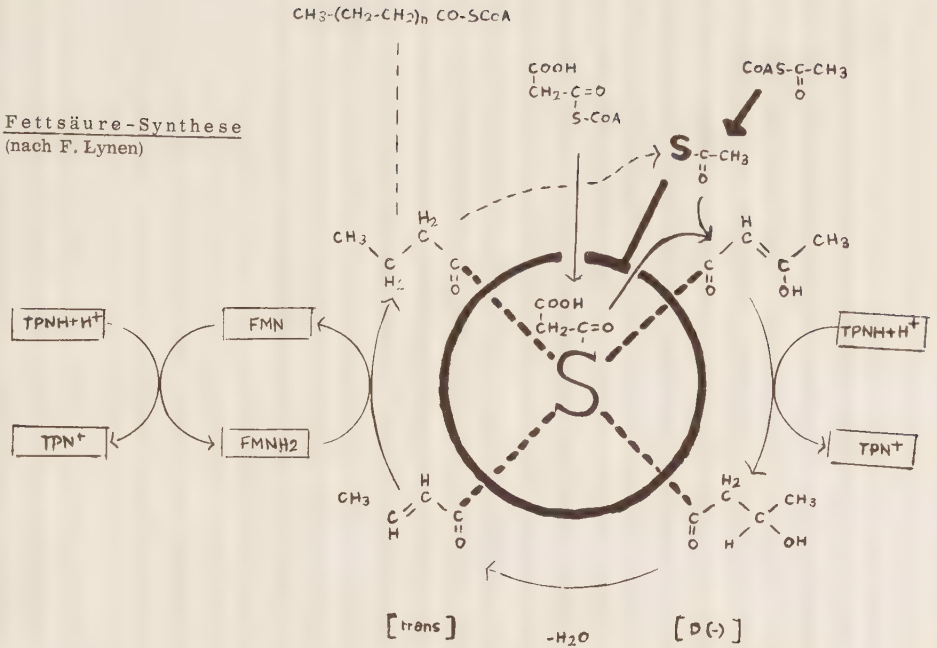
4) Wasserabspaltung unter Bildung eines ß-ungesättigten Thioesters.

5) Hydrierung der Doppelbindung unter Bildung eines S-Butyryl-Enzyms. Die Wasserstoffübertragung vom TPNH auf die Doppelbindung wird bei diesem Schritt durch Flavinmononucleotid (FMN) vermittelt.

6) Transfer des gebildeten gesättigten Fettsäureesters von der zentralen auf die periphere SH-Gruppe des Enzymkomplexes.

Als Ergebnis dieser Reaktionsfolge ist die Kohlenstoffkette um eine C_2-Einheit verlängert worden. Der Reaktionscyclus kann dann, ausgehend vom Butyryl-Malon-Enzym, mehrmals erneut ablaufen, bis schließlich der fertig synthetisierte Palmitylrest wieder auf freies Coenzym A übertragen wird.
Dieser Mechanismus unterscheidet sich von der eingangs diskutierten Reaktionsfolge zunächst dadurch, daß die gebildeten Zwischenprodukte in einer enzymgebundenen Form auftreten. Der fundamentale Unterschied liegt aber in der Kondensationsreaktion selbst. Anstelle der aktivierten Essigsäure tritt hier eine aktivierte Malonsäure (S-Malonyl-Enzym), deren Kondensation mit einer aktivierten gesättigten Fettsäure (S-Acyl-Enzym) unter gleichzeitiger Decarboxylierung die Bildung der ß-Ketoderivate begünstigt und damit bei jedem Kondensationsschritt den Prozeß in Richtung der Synthese treibt.

Der bei der Carboxylierung von Acetyl-CoA (Gl. 2 und 3) mit der Spaltung von ATP bereitgestellte Energiebetrag wird also letztlich erst bei der Kondensationsreaktion freigesetzt und gestaltet so den synthetischen Prozeß praktisch irreversibel.
Der Rückgang der Fettsäuresynthese beim Diabetes und im Hungerzustand wurde ursprünglich mit einem verminderten Angebot des für die Synthese erforderlichen TPNH aus dem Pentosephosphatcyclus erklärt. Die Aufklärung getrennter Auf- und Abbauwege für die Fettsäuren ergab jedoch gänzlich neue Ansatzpunkte, um in den Mechanismus der Steuerung des Fettsäurestoffwechsels einzudringen. Durch Beeinflussung eines einzigen Reaktionsschrittes kann z. B. der synthetische Prozeß völlig unterbunden werden, ohne daß dabei die Oxydation in irgend einer Weise beeinträchtigt wird. Derartige Verhältnisse liegen für den Fettstoffwechsel im Hunger und beim Diabetes vor. Unter diesen Bedingungen ist die Überführung von Acetyl-CoA in Malonyl-CoA stark gedrosselt. Gleichzeitig ist auch die Fettsäuresynthese fast vollständig unterbunden, während der Fettsäureabbau sogar erhöht ist.


Fettsäure-Synthese
(nach F. Lynen)
CH3-(CH2-CH2)n CO-SCoA
COOH
CH2-C=O
S-CoA
CoAS-C-CH3
O
S-C-CH3
O
TPNH+H+
TPN+
FMN
FMNH2
TPNH+H+
TPN+
COOH
CH2-C=O
S
[trans]
-H2O
[D(-)]

BEDEUTUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die Gallensäuren stellen das mengenmäßig wichtigste Abbauprodukt des Cholesterins dar. Sie werden durch die Leber mit der Gallenflüssigkeit ausgeschieden und dann zum großen Teil rückresorbiert. Auf diesn sog. "Enterohepatischen Kreislauf" und die Rolle der Gallensäuren beim Verdauungs- und Resorptionsprozeß der Fette im Darm wird noch eingegangen. Die Gallenbildung ist eine der wichtigsten Funktionen der Leber. Die Galle dient sowohl der Ausscheidung von Endprodukten des Stoffwechsels und der Ausscheidung von Fremdstoffen als auch der Verdauung und Resorption der Lipide. Die Gallenproduktion der Leber unterliegt starken Schwankungen und kann sowohl auf nervösem als auch auf humoralem Wege beeinflußt werden. Das Sekretin scheint auch auf die Ausscheidung der Galle einen stimulierenden Einfluß auszuüben. Die Ausscheidung der Galle wird durch die Gallensäuren selbst angeregt. Daher werden in der Klinik Gallensäuren als gallentreibende Mittel verwendet. Die Gallenbildung ist auch von der Art der Nahrung abhängig. Sie wird durch Fett und Fleisch gesteigert, während Kohlenhydrate keinen Einfluß ausüben. Das Sekret der Leberzellen ist die Lebergalle, die durch den Gallengang in die Gallenblase gelangt, wo sie durch Rückresorption konzentriert wird (Blasengalle).
Während die Lebergalle auf Grund ihres Bilirubingehaltes rein gelb ist, ist die Blasengalle grün oder dunkelbraun gefärbt.
Das beruht auf oxydativen Umwandlungen des Bilirubins. Der Vergleich der Zusammensetzung zwischen Leber- und Blasengalle zeigt, daß es sich nicht nur um eine Eindickung organischer Bestandteile durch Rückresorption von anorganischen Stoffen handelt.
Die Cholesterin-Konzentration in der Galle ist so hoch, daß eine übersättigte Lösung vorliegt. Vermutlich wird die Ausfällung des Cholesterins durch die Salze der Gallensäuren vermindert. Bei entzündlichen Prozessen kommt es durch im einzelnen noch nicht geklärte Vorgänge zur Bildung von kristallisierten Ablagerungen zu den Gallensteinen, die zu 80 bis 90 % aus Cholesterin bestehen. Zur Steinbildung trägt auch die Ausfällung der Gallenfarbstoffe als Calciumsalze bei. Es ist heute erwiesen, daß die Gallensäuren überwiegend, wenn auch nicht ausschließlich, aus Cholesterin entstehen. Diese Umwandlungen bedingen eine Verkürzung der aliphatischen Seiten-

kette um drei C-Atome sowie die Einführung von Hydroxylgruppen, die im Vergleich mit der ß-Hydroxylgruppe des Cholesterins eine entgegengesetzte räumliche Lage besitzen. Die Hauptmenge der mit der menschlichen Galle ausgeschiedenen Säuren wird von der Cholsäure und der Chenodesoxycholsäure gestellt. Daneben kommen die Desoxycholsäure und in geringer Menge die Lithocholsäure vor, die wahrscheinlich Produkte der Darmmikroben sind.

Bei der Suche nach Stoffen, die die Fettsäuresynthese in hemmendem Sinne beeinflussen - eventuell auch für klinische Zwecke ausnutzbar - , stießen wir auf die in der Galle physiologisch vorkommenden Gallensäuren (nämlich Glykochol- und Taurocholsäure). Mit beiden wurden in vitro Vorversuche unternommen, wobei sich eine Hemmung der Fettsäuresynthese zeigte.

Nach KAWAMOTO können Glykocholsäure und Taurocholsäure den Fettstoffwechsel und auch den Kohlenhydratstoffwechsel behindern. Andererseits wurde eine lipotrope Wirkung von Gallensäuren beobachtet. So konnte bei cholinarmer Kost eine Leberverfettung verhindert werden, wenn gleichzeitig Gallensäuren verabreicht wurden. Der Autor nimmt an, daß die Gallensäuren die Cholinbildung begünstigen und damit die Phosphatidsynthese fördern. Beide Hypothesen lassen sich mit unseren Ergebnissen in Einklang bringen.

Die Aufgabe dieser Arbeit besteht darin, experimentell den Einfluß von Glykocholund Taurocholsäure und den Einfluß beider Säuren in Kombination mit Biotin auf die Fettsäuresynthese in der Taubenleber zu prüfen.

EXPERIMENTELLER TEIL

Als Ausgangsmaterial für unsere Versuche nahmen wir Taubenlebern, in denen die nötigen Fermente für den Fettstoffwechsel, neben denen der Glykolyse und Atmung, in ausreichender Menge vorhanden sind. Dieses System vermag in vitro Acetat zu höheren Fettsäuren zu synthetisieren, wobei im Mittel etwas 25 % des eingesetzten Acetats in höhere Fettsäuren eingebaut werden. Hierbei treten jedoch beträchtliche Unterschiede auf, die wohl auf die Stoffwechsellage der Tiere zurückzuführen sind. Von entscheidender Bedeutung erwies sich hier der Ernährungszustand und das Alter der Tauben.

Wir untersuchten nun die Ausbeute der aus C^{14}-Na-Acetat synthetisierten höheren Fettsäuren vor und nach Zugabe von wechselnden Konzentrationen kurzkettiger Fettsäuren.

Die Aufarbeitung der Taubenlebern erfolgte nach den Vorschriften von Brady und Gurin.

Darstellung des verwendeten Enzymsystems

Die Lebern drei bis vier Monate alter Tauben wurden verarbeitet. Um ein möglichst aktives Enzymsystem zu erhalten, mußten die Tiere wenigstens drei Tage vor dem Schlachten reichlich mit Weizenkörnern gefüttert worden sein. Die Tauben wurden decaptiert und sofort anschließend die Lebern herauspräpariert, von Bindegewebe befreit und in Eiswasser aufbewahrt. Lebern, die in Farbe oder Größe von der Norm abwichen oder die makroskopisch Tumoren oder Cysten aufwiesen, wurden verworfen. Die Lebern wurden zerkleinert und mit der 1,2 fachen Menge eines Phosphat-Hydrogencarbonat-Puffers von folgender Zusammensetzung versetzt: 0,009 m KH_2PO_4, 0,095 m K_2HPO_4, 0,07 m $KHCO_3$ im Verhältnis 1 : 1 : 1; pH = 7,4. Zur Zerstörung der Zellwände wurden die zerkleinerten Lebern mit dem Puffer vorsichtig in einem Potter-Elvehjem-Apparat homogenisiert. Alle Manipulationen wurden bei 0° C ausgeführt. Zur Entfernung der Zellbestandteile wurde das Homogenat zuerst 45 Minuten bei 2 000 Umdrehungen min zentrifugiert, der resultierende Überstand (supernatant fluid = Sup) mit o. a. Puffer auf das 1,333fache Lebergewicht aufgefüllt und

weitere 75 Min bei 25000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Von dem sich ergebenden Überstand = Sup wurden jeweils 2,4 ml in jeden Versuchsansatz eingesetzt, das entspricht etwa 2 g Leber.
Der Sup enthält noch Mitochondrien und Mikrosomen, die sich erst bei 100000 Umdrehungen/min setzen würden, doch stand eine entsprechende Ultrazentrifuge nicht zur Verfügung.

INKUBATION

Um die Fettsäuresynthese in Vitro zu ermöglichen und um eine möglichst hohe Ausbeute zu erhalten, sind außer den im Sup enthaltenen Fermenten einige Cofaktoren in bestimmten Konzentrationen nötig, die durch V. BRAND in abgeänderter Form angegeben wurden. Jeder Versuchsansatz enthielt folgende Zusammensetzung:

1. Konstante:

$MgCL_2$ = 0,1 ml Natriumcitrat. 6 H_2O = 0,1 ml.
Na-C^{14}-Acetat = 0,4 ml.

2. nicht Konstante:

Der zu untersuchende Stoff.

Es wurde alles in ein 20 ml-Warburgkölbchen einpipettiert, die Kölbchen wurden verschlossen und vier Stunden bei 38° C $\pm$ $0,1^{\circ}$ unter ständigem leichten Schütteln im Warburg-Apparat inkubiert.
Wurde die Inkubation bei CO_2-Atmosphäre durchgeführt, so wurden die bereits im Warburg-Apparat eingesetzten Kölbchen zuerst 10 Min mit CO_2 begast und anschließend verschlossen. Zum Druckausgleich waren die Kölbchen an ein Manometer in Form eines mit Flüssigkeit gefüllten U-Rohres angeschlossen.

Isolierung der synthetisierten Fettsäuren

Im Laufe der Inkubation wurden aus dem aktiven Acetat durch das Fermentsystem höhere Fettsäuren synthetisiert. Zur Isolierung der Fettsäuren wurde das Reaktionsgemisch zuerst verseift und anschließend die höheren Fettsäuren mit Petroläther

extrahiert. Der Inhalt des Warburgkölbchens wurde mit 5 ml aqua bidest. in ein birnenförmiges Schliffkölbchen übergespült und zusammen mit 5 ml 30 %iger KOH und 25 mg Palmitinsäure als Trägersubstanz vier Stunden unter gelindem Sieden mit Rückfluß verseift.
Nach der Verseifung wurde der Inhalt des Schliffkölbchens mit 18 %iger HCL bis zum Umschlag eines Bromkresylgrün-Methylorange-Indikators angesäuert und viermal mit Petroläther in einem Abscheidetrichter ausgeschüttelt. Die Petrolätherauszüge wurden in einem kleinen Becherglas eingedampft.

Im Rückstand befanden sich die aus aktivem Acetat synthetisierten höheren Fettsäuren; eventuelle Beimengungen anderer Fettsäuren aus dem Reaktionsgemisch spielten keine Rolle, da sie auf die Höhe der Aktivität keinen Einfluß haben.

Messung der synthetisierten Fettsäuren

Die extrahierten Fettsäuren wurden in einem Meßkölbchen auf 10 ml mit Petroläther aufgefüllt. 1 ml dieses die Fettsäuren enthaltenden Petrolätherauszugs wurde auf ein mit "Lenspaper" (silikongetränktes Papier zur Reinigung von Linsen) belegtes Aluminiumplättchen, Ø 3 cm, aufgetropft, an der Luft getrocknet und die Radioaktivität nach der direkten Methode von ENTEMANN und DAUBEN gemessen. Es wurden von jedem Versuchsansatz vier Plättchen gegossen und gemessen und deren arithmetisches Mittel als Ergebnis verwertet. Die in den Versuchen erscheinenden Zahlen entsprechen diesem Durchschnittswert eines Plättchens und werden in Impulsen pro Minute angegeben. Die Anzahl der Imp/min ist gleichbedeutend einem Zehntel des in höhere Fettsäuren eingebauten radioaktiven Kohlenstoffs. Von jeder Versuchsreihe wurde einem Ansatz keine hemmende oder fördernde Substanz beigefügt. Dieser Ansatz entspricht somit der fettsäuresynthetisierenden Fähigkeit des verwendeten Enzymsystems. Die Höhe der Radioaktivität dieses Ansatzes wurde als Ausgangsaktivität bezeichnet und im Vergleich zu den anderen Versuchsansätzen 100 % gesetzt. Alle anderen Versuche beziehen sich in ihren Prozentzahlen auf diese Ausgangsaktivität.

ZEITKURVEN

Diese Versuche verlaufen grundsätzlich wie die vorher beschriebenen. Es wird lediglich nach 20, 40, 80 und 180 Minuten die Inkubation im Warburg-Apparat unterbrochen und gleich anschließend verseift.
Auf diese Weise erhält man einen genauen Verlauf der Fettsäuresynthese.
Als Ausgangswert für die Fettsäuresynthese wurde 100 % angenommen. Nach Zusatz der Säuren und ..... sind die Fettsäuresynthesewerte errechnet worden.
Diese Werte wurden in Berechnungstabellen aufgeführt.

Versuch 840

Bei diesem Versuch wurde Sup-pur allein und kombiniert mit 1 mg Taurocholsäure getestet:
Dieser Versuch wurde in verschiedenen Zeitabständen durchgeführt.

100 mg Taurochols. / 10 ml absol. Alkohol = 1 mg / 0,1 ml

Zusatz	Nullwert	20'	40'	80'	120'	180'	Imp/min
Sup-pur	-	2030	3060	4660	4410	4851	"
Taurochols.	-	660	1580	1942	2030	1179	"

Aus dieser Bewertungstabelle und graphischen Darstellung ist zu ersehen, daß die größte Hemmung nach 180 Minuten erfolgt, so daß die beiden Kurven divergent verlaufen.

Versuch 840

Bei diesem Versuch wurde Sup-pur allein und kombiniert mit 1 mg Taurocholsäure getestet:
Dieser Versuch wurde in verschiedenen Zeitabständen durchgeführt.

100 mg Taurochols. / 10 ml absol. Alkohol. = 1 mg / 0,1 ml

Zusatz	Nullwert	20'	40'	80'	120'	180'	Imp/min
Sup-pur	-	2030	3060	4660	4410	4851	"
Taurochols.	-	660	1580	1942	2030	1179	"

Aus dieser Bewertungstabelle und graphischen Darstellung ist zu ersehen, daß die größte Hemmung nach 180 Minuten erfolgt, so daß die beiden Kurven divergent verlaufen.

Versuch 843

Bei diesem Versuch wurde Taurocholsäure in drei verschiedenen Konzentrationen allein und kombiniert mit Faktor und unter CO_2 Begasung getestet:

Zusatz	0,1 mg	0,5 mg	1 mg	Imp/min
1. Taurochol	4165	1960	1364	"
säure	100,8 %	47,4 %	33,1 %	
2. Taurochol	3540	3050	2699	"
säure + CO_2	85,4 %	73,7 %	65 %	
3. Taurochol	4640	3560	2130	"
säure + Faktor	112 %	86,1 %	51,3 %	

Sup-pur : 4145 Imp/min = 100 % Sup + CO_2 : 4140 Imp/min = 99,9 %
Sup + Faktor : 4475 Imp/min = 108 %

Aus der Bewertungstabelle ist zu entnehmen, daß die kleinste Menge (0,1 mg) von Taurocholsäure bei Versuch 3 eine geringe Steigerung der Synthese verursacht, bei weiterer Zunahme von Taurocholsäure tritt eine deutliche Hemmung um rund 50 % ein. Zusatz 1 zeigt bei 0,1 mg keine Wirkung, bei 0,5 mg und 1,0 mg relativ starke Hemmung. Unter Begasung mit CO_2 bei einem Versuchsansatz von 1,0 mg Taurocholsäure verbessert sich die Hemmung prozentual um 32 %.

Versuch 849

Bei diesem Versuch wurden zwei verschiedene Gemische getestet:
Die Lösung 1 ist Sup-pur.
Bei Gemisch 2 fügt man dem Sup 1 mg Taurocholsäure hinzu.

Zusatz	20'	40'	80'	120'	180'	Impulse / min
1	1255	3520	4375	5400	600	"
2	311	981	447	600	810	"

Bei diesem Versuch zeigt, die Taurocholsäure eine während der ganzen Versuchsdauer annähernd gleich niedrige Impulszahl.

Versuch 850

Bei diesem Versuch wurde die Glykocholsäure in zunehmender Konzentration vom 0,5 mg bis 1 mg getestet:

Zusatz	0,5 mg	1 mg	5 mg	10 mg	Imp/min
Glykochol	5720	3350	92	43	"
säure	52 %	47,9 %	1,32 %	0,613 %	

Sup-pur: 7000 Impulse / min = 100 %

Wie man aus der Bewertungstabelle und graphischen Darstellung ersieht, nimmt die Hemmwirkung der Glykocholsäure mit zunehmender Konzentration stark zu, bei 10 mg betrug sie fast 100 %.

Versuch 851

Bei diesem Versuch wurde die Taurocholsäure in zunehmender Konzentration von 0,5 mg bis 10 mg allein und unter CO_2-Begasung getestet:

Zusatz	0,5 mg	1 mg	5 mg	10 mg	Ausgangsaktivität Imp/min
Taurochol	4750	3500	95	109	"
säure	79,2%	58,4%	1,58%	1,82 %	
Taurochol	6300	4050	3150	258	"
säure + CO_2	105 %	67,5 %	52,5 %	4,3 %	

Sup: 6000 Imp/min = 100 % Sup + CO_2: 4360 = 72,8 %

Dieser Versuch gleicht sehr dem Versuch 852. Bei diesem Versuch fällt jedoch auf, daß bei Zufügung von 5 mg Taurocholsäure unter CO_2-Begasung deutlich höhere Werte bzw. geringere Hemmung als im Versuch 852 vorhanden sind.
Die graphische Darstellung zeigt eine Divergenz bei 5 mg und eine anschließende Konvergenz bei 10 mg.

Versuch 852

Bei diesem Versuch wurde die Glykocholsäure in zunehmender Konzentration von 0,5 mg bis 10 mg allein und unter CO_2-Begasung getestet:

Zusatz	0,5 mg	1 mg	5 mg	10 mg	Ausgangsaktivität Imp/min
Glykochol	-	720	101	127	"
säure		20,1 %	2,82 %	3,55 %	
Glykochol	5300	3660	261	146	"
säure + CO_2	148 %	102 %	7,3 %	4,7 %	

Sup: 3590 Imp/min = 100 % Sup + CO_2: 6580 Imp/min = 183 %
Faktor: 5390 Imp/min = 150 % Faktor + CO_2: 7470 Imp/min = 208 %

Aus der Bewertungstabelle ist zu ersehen, daß der hemmende Einfluß von Glykocholsäure bei zunehmender Menge besonders im Bereich von 1 mg bis 5 mg stark zunimmt. Die zusätzliche CO_2-Begasung bei allen Versuchen von 0,5 mg bis 10 mg Glykocholsäure führt zu einer Minderung der Hemmung.
Die graphische Darstellung zeigt, daß die beiden Kurven steil abfallen und anschließend parallel verlaufen.

Versuch 859

Bei diesem Versuch wurde Taurocholsäure in zunehmender Konzentration von 0, 5 mg bis 3 mg allein und kombiniert mit Biotin (0, 001 gamma) getestet:

Zusatz	0, 5 mg	1 mg	3 mg	Impuls/min
1. Taurochol	3907	2848	455	"
säure	69, 3 %	50, 5 %	8, 08 %	
2. Taurochol	5882	3849	1020	"
säure + 0, 001				
Biotin	104 %	68, 2 %	18, 1 %	

Sup-pur: 5636 = 100 % Sup + Biotin (0, 001 gamma): 5809 Imp/min = 103 %

Wie man aus den graphischen Zeichnungen und aus den Zusammenstellungen ersieht, der Zusatz 1 zeigt bei zunehmender Konzentration einen starken Abfall, wobei bei Zusatz 2 dieser Abfall stark gemindert wird.

Versuch 854

Bei diesem Versuch wurden Glykocholsäure und Taurocholsäure in zunehmender Konzentration getestet:

Zusatz	0, 5 mg	1 mg	3 mg	5 mg	10 mg	Imp/min
Taurochol-	4630	2950	357	258	265	"
säure	88, 5 %	56, 2 %	6, 81 %	5, 33 %	3, 06 %	
Glykochol-	3600	2740	438	187	165	"
säure	68, 8 %	52, 2 %	8, 38 %	3, 57 %	3, 15 %	

Sup: 5230 Impuls/min = 100 %

Aus der Bewertungstabelle ist zu ersehen, daß die Zahl der Impulse sowohl bei Taurocholsäure als auch bei Glykocholsäure bei zunehmender Menge im Bereich von 0, 5 mg - 3 mg steil abfällt und bei weiterer Zunahme auf 10 mg keine wesentliche Zunahme der Hemmung mehr zeigt. Auf der graphischen Darstellung sieht man zwei annähernd parallel verlaufende Kurven.

Versuch 861

Bei diesem Versuch wurden drei verschiedene Gemische getestet:
Die Lösung 1. ist Sup-pur,
bei Gemisch 2. fügt man dem Sup 4, 5 mg Glykocholsäure hinzu.
das Gemisch 3. besteht aus 4, 5 mg Taurocholsäure.

Zusatz	Nullwert	nach 20'	nach 40'	nach 80'	nach 180'	Impuls/min
1	-	602	558	378	572	"
2	-	420	728	440	780	"
3	-	693	500	750	437	"

Die nebenstehende Bewertungstabelle ergibt, daß die Impulse/min bei allen drei Gemischen niedrig sind und zwar die höchsten Werte erfolgen bei Zusatz 2 nach 40 Minuten und bei Gemisch 3 nach 20' und 80 Minuten.
Die Kurven verlaufen ziemlich zickzackförmig.

Versuch 868

Bei diesem Versuch wurden drei verschiedene Gemische getestet:
Die Lösung 1 ist Sup-pur
Bei Gemisch 2 fügt man dem Sup 3 mg Taurocholsäure hinzu.
Das Gemisch 3 besteht aus Gemisch 2 und 30 mg Trockenpulver.

Zusatz	Nullwert	nach 20'	nach 40'	nach 80'	nach 180'	Imp/min
1	-	1260	1330	2580	2540	"
2	-	160	198	157	184	"
3	-	162	239	220	292	"

Wie man aus der Tabelle und der graphischen Darstellung ersieht, wenn man den Kurvenverlauf der drei verschiedenen Gemische in den verschiedenen Zeitabständen vergleicht, sind bei Taurocholsäure allein (2) die Impulse gering und zwar bei 160 Imp/min nach 20' und sie steigen langsam nach 180' auf 184/min. Bei Kombination (3) bestehen ebenfalls nach 20' niedrige Impulswerte um 162/min und steigen nach 80' auf 292/min an. Die Kurven bei den Gemischen zwei und drei laufen parallel und zeigen keine erhebliche Steigerung.

Versuch 871

Bei diesem Versuch wurde das Biotin in abnehmender Konzentration (10 gamma - 0,01 gamma) allein und kombiniert mit 1 mg Taurocholsäure untersucht:

Zusatz	10	1,0	0,1	0,01	Impuls/min
Biotin	4760	4660	4650	4980	"
	95,5 %	93,5 &	93,2 %	100 %	
Biotin + 1 mg Taurocholsäure	2180	1670	1960	2830	"
	43,8 %	33,5 %	39,3 %	56,9 %	

Sup-pur: 4980 Impulse/min = 100 %

1 mg Taurocholsäure: 1710 Imp/min = 34,3 %

Die nebenstehende Bewertungstabelle ergibt, daß die Fettsäuresynthese durch Biotin allein nicht sehr stark beeinflußt wird. In Kombination mit 1 mg Taurocholsäure zeigt sich eine deutliche Hemmung um 50 % bis 60 %.

Versuch 874

Bei diesem Versuch wurde das Biotin in drei verschiedenen Konzentrationen von (10, 0,1 und 0,01 gamma) allein und kombiniert mit 1 mg Taurocholsäure getestet:

Zusatz	10 gamma	0,1 gamma	0,01 gamma	Imp/min
Biotin	292	264	302	"
	91 %	101,5 %	114 %	
Biotin + 1 mg Taurocholsäure	56	143	103	"
	21,1 %	54 %	38 %	

Sup-pur: 265 Imp/min = 100 % 1 mg Taurochols.: 73 Imp/min = 27,6 %

Dieser Versuch ist dem Versuch 871 sehr ähnlich, weil fast die gleichen Lösungen verwendet wurden.

Versuch 878

Bei diesem Versuch wurden drei verschiedene Gemische getestet:

Die Lösung 1 ist Sup-pur.

Bei Gemisch 2 fügt man dem Sup 3 mg Taurocholsäure hinzu.

Das Gemisch 3 besteht aus Gemisch 2 und 10 mg Trockenpulver.

Zusatz	Nullwert	20'	40'	80'	180'	Ausgangsaktivität Imp/min	
1	-	535	999	1852	1780	"	"
2	-	34	52	29,5	72	"	"
3	-	32	51	57,5	128	"	"

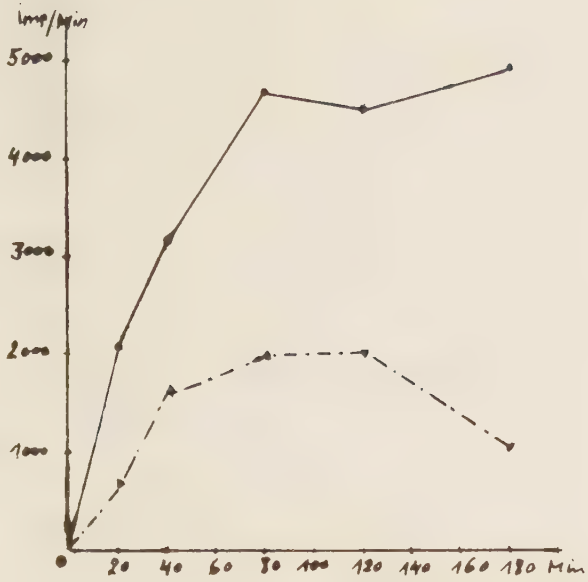
Dieser Versuch gleicht in weitem Umfang dem Versuch 868, denn es wurden fast die gleichen Lösungen verwendet. Wie man aus dem Vergleich der beiden Versuche sieht, bewirkt die Konzentrationszunahme vom Trockenpulver keine größere Änderung. Die Kurven laufen bei beiden Versuchen ziemlich gleich.

Versuch 826

——— Sup

- - - - - - - - Sup + 1 mg Taurocholsäure

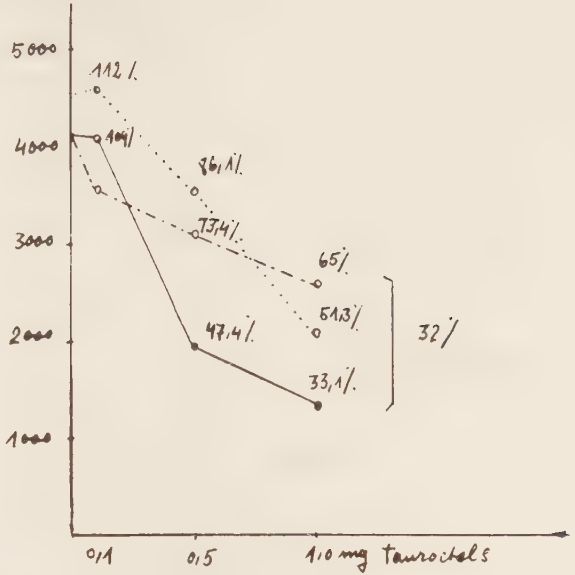
Taurocholsäure
100 mg/10 ml absol. Alkohol
1 mg/0,1 ml



- - - - - - - - Sup + Faktor + Taurocholsäure

——— Sup + Taurocholsäure

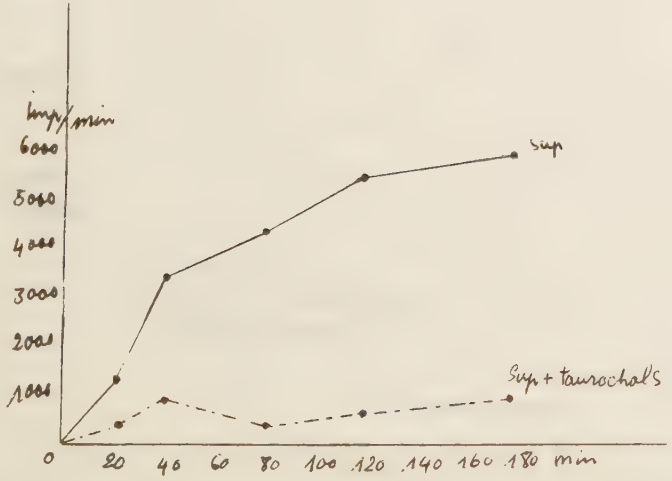
- - - - - - - - Sup + CO_2 + Taurocholsäure



Versuch 849

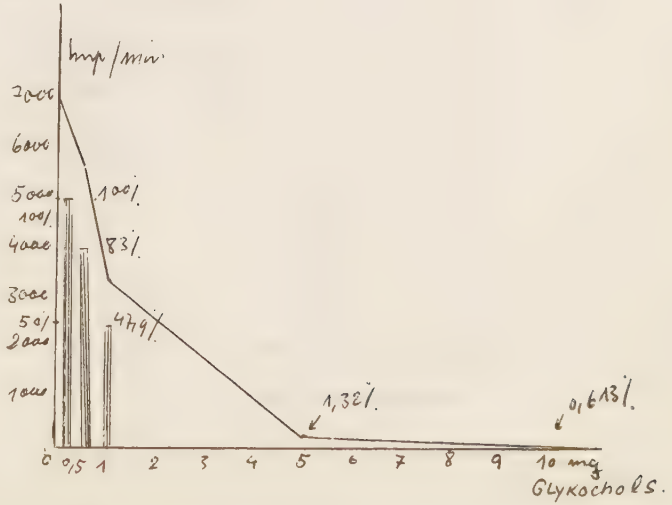
——— Sup

- - - - - - - - Sup + 1 mg Taurocholsäure



Versuch 850

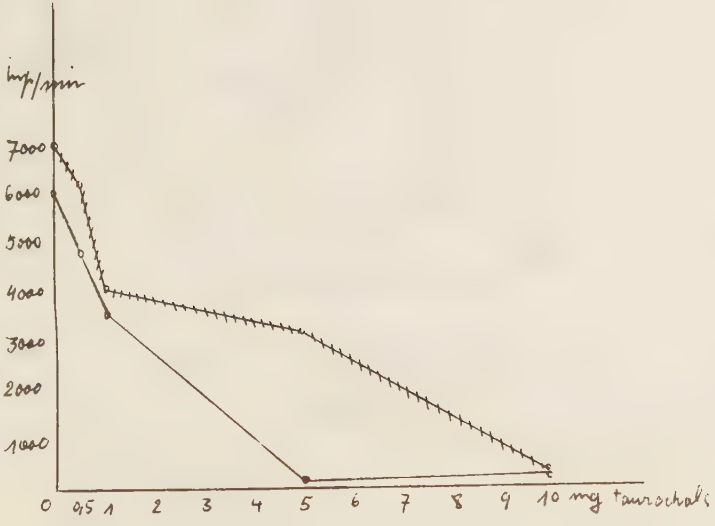
——— Glykocholsäure

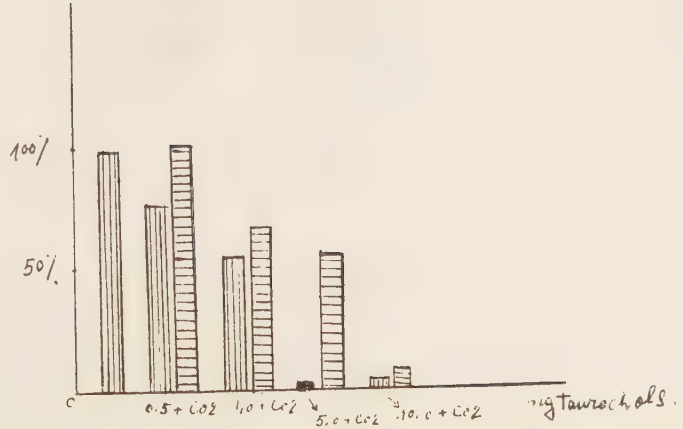


Versuch 851

---------- Sup + Taurocholsäure + CO_2

———— Sup + Taurocholsäure

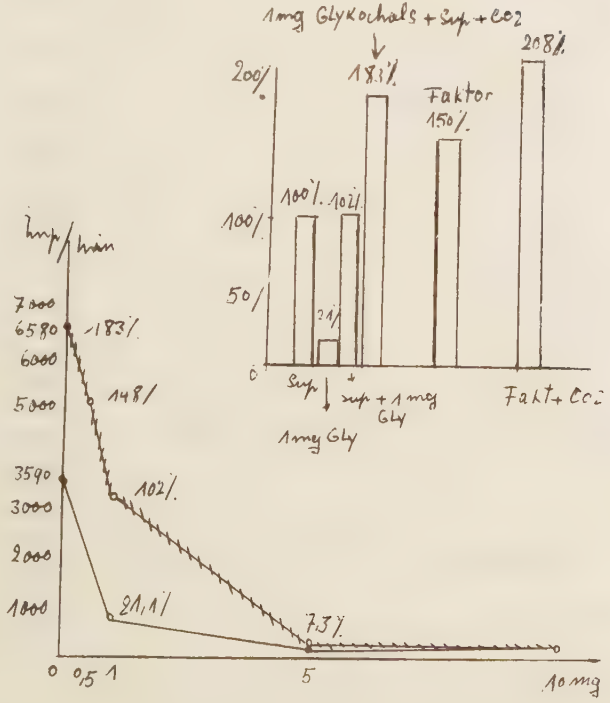




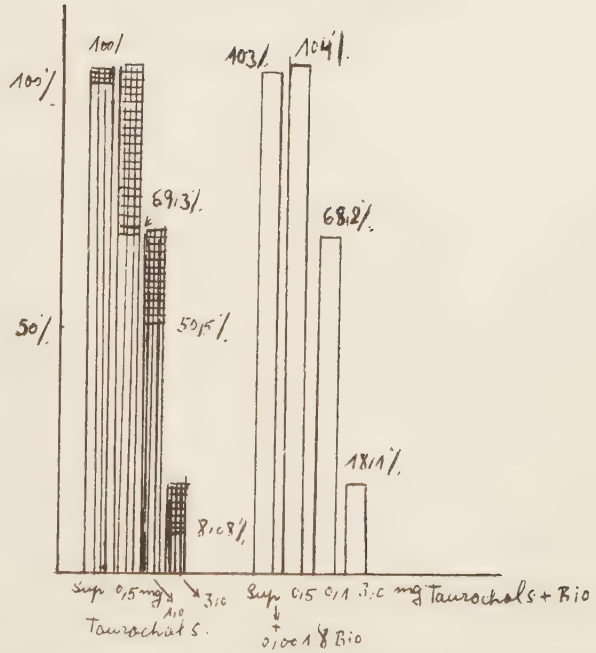
Versuch 852

---------- Glykocholsäure

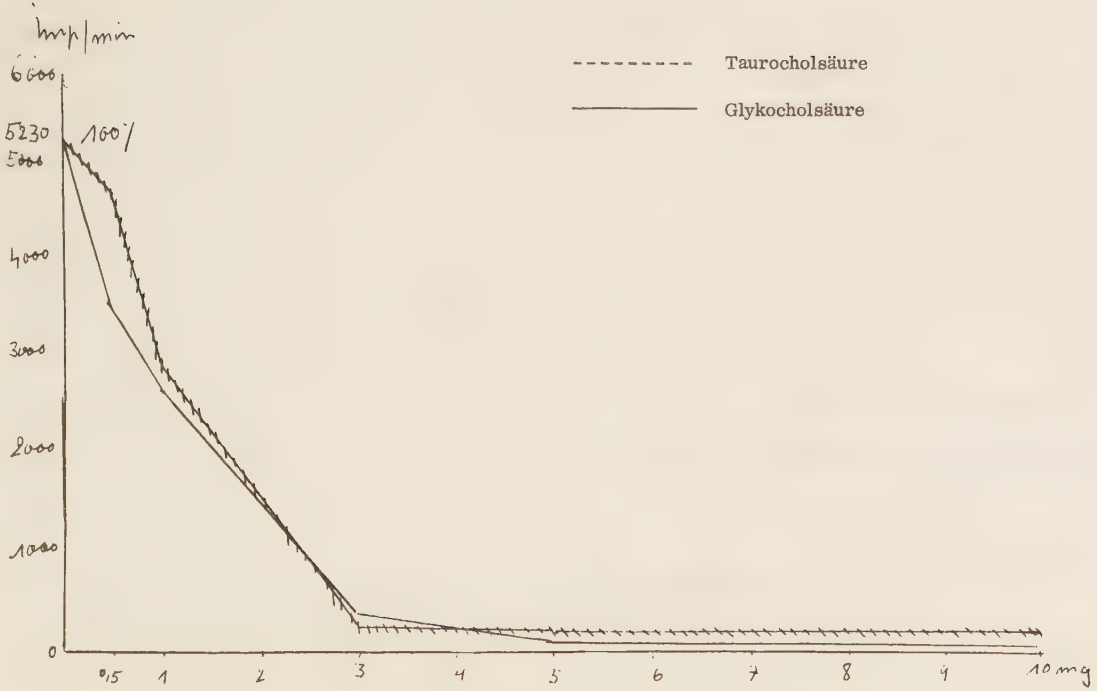
———— Sup + Glykocholsäure



Versuch 859



Versuch 854

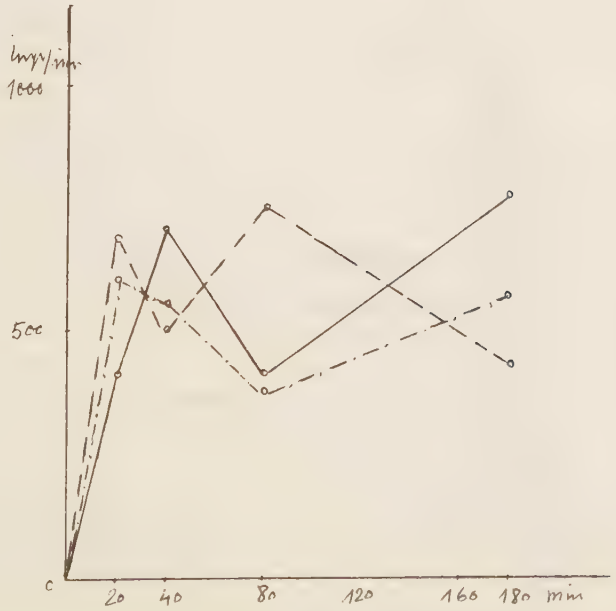

Imp/min
6000
5230
100%
5000
4000
3000
2000
1000
0
0,5
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10 mg
Taurocholsäure
Glykocholsäure

Versuch 861

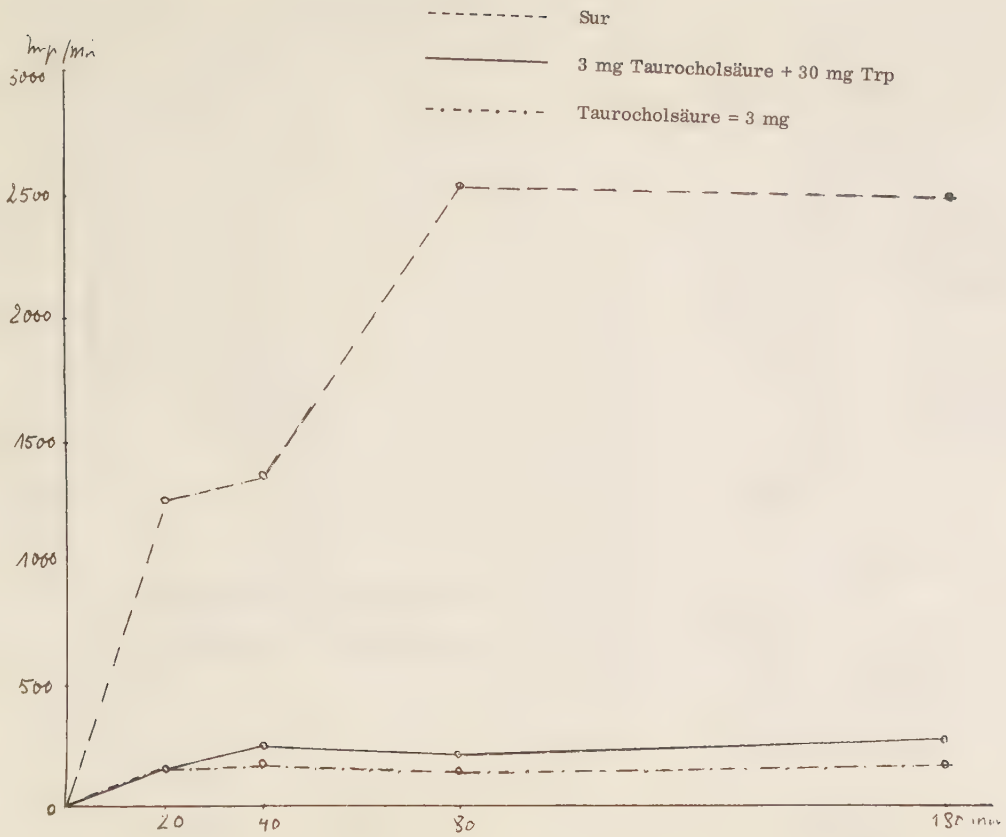
- - - - - - - - Sup - Pur

———— Sup + 4, 5 mg Glykocholsäure

- - - - - - - - - Sup + 4, 5 mg Taurocholsäure



Versuch 868


Sur
3 mg Taurocholsäure + 30 mg Trp
Taurocholsäure = 3 mg
mg/min
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
20
40
80
180 min

Versuch 874

2 = Taurocholsäure

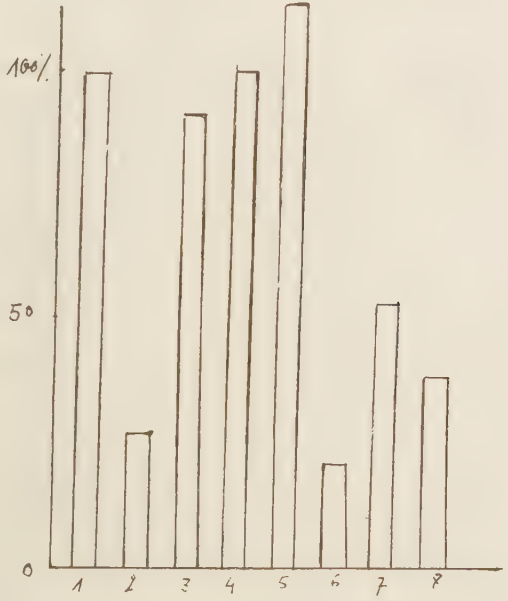
3 = 10, 08 Biotin

4 = 0, 18 Biotin

5 = 0, 01 gama Biotin

6 = 10, 0 gama Biotin + 1 mg Taurocholsäure

7 = 0, 1 gama Biotin + 1 mg Taurocholsäure



Versuch 871

1 = Sup

2 = 1 mg Taurochols

3 = 10, 0 gama Biotin

4 = 1, 0 gama Biotin

5 = 0, 1 gama Biotin

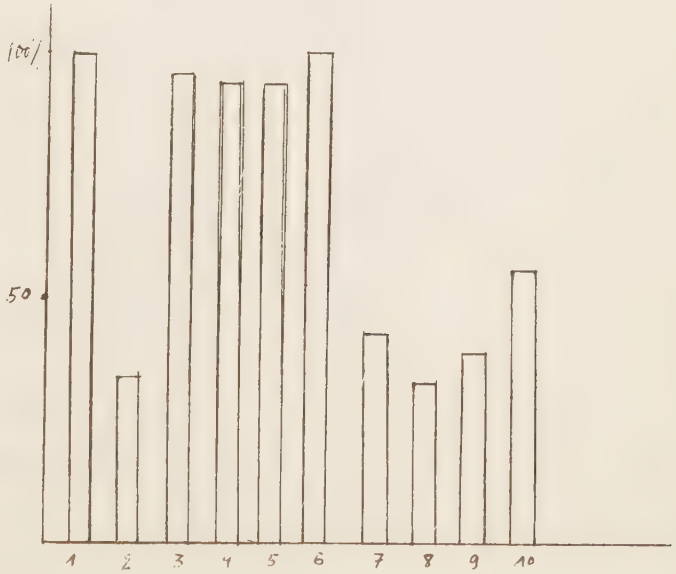
6 = 0, 01 gama Biotin

7 = 10, 0 gama Biotin + 1 mg Taurocholsäure

8 = 1, 0 gama Biotin + 1 mg Taurocholsäure

9 = 0, 1 gama Biotin + 1 mg Taurocholsäure

10 = 0, 01 gama Biotin + 1 mg Taurocholsäure

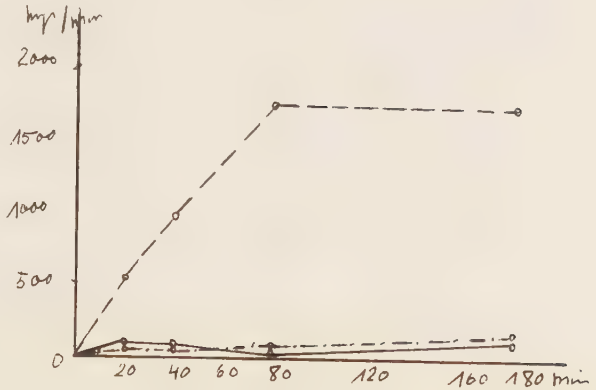


Versuch 878

Sup - Pur

Sup + 3 mg Taurocholsäure

Sup + 3 mg Taurocholsäure + 10 mg Trockenpulver



ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde über die Beeinflussung der Fettsäuresynthese in einem fettsynthetisierenden Enzymsystem aus Taubenleber durch Zugabe von gepaarten Gallensäuren, Glykocholsäure und Taurocholsäure geschrieben. Jeder Versuch wurde kurz erläutert und die Versuchsergebnisse ausführlich erklärt.

Als Ausgangswert für die Fettsäuresynthese wurde 100 % angenommen.

Nach Zusatz von Gallensäuren wurde die Fettsäuresynthesewerte in Impulse/min errechnet. Diese Werte sind in der vorliegenden Arbeit in Berechnungstabellen aufgeführt.

Abschließens möchte ich die wichtigsten Ergebnisse wie folgt zusammenfassen:

Die Versuche zeigten, daß die Gallensäuren, nämlich Glykocholsäure und Taurocholsäure, eine hemmende Wirkung auf die Fettsäuresynthese haben. Dabei war die stärkste Hemmung bei einer Gallensäurekonzentration von 0,3 - 0,5 mg/3 ccm zu beobachten. Höhere Konzentrationen erreichten nur noch eine geringfügige weitere Zunahme der Hemmung.
Durch Begasung der zuvor durch Zugabe von Gallensäuren gehemmten Versuchsansätze mit CO_2, kann die Hemmung der Fettsäuresynthese vermindert werden.
Der Zusatz von Biotin in zunehmender Konzentration bewirkte eine relative Steigerung der Fettsäuresynthese, welche ebenfalls zuvor im Versuchsansatz durch gepaarte Gallensäuren gehemmt war.

Literaturverzeichnis

1. S. M. Rapoport. Medizinische Biochemie. Berlin 1965. Kapitel 342-344
2. Knoop, F., Beitr. chem. Physiol. Pathol. 6, 150 (1905)
3. Walkil, S.J., Biochem. et Biophys. Acta 19, 497 (1956)
4. Kornberg, A. und Pricer, W. E., J. Biol. Chem. 204, 329 (1953)
5. Lynen, F., Harwey Lect. 44, 99 (1952-53)
6. Chandler, R. J., Comp. Path. 72 (1962), 198, in med. Wschr. Nr. 2 (1965)
7. Beinert, H., Green, D. E., Hele, P., Hift, H., von Korft, R. W. und Ramakrishman, C. V., J. Biol. chem. 203, 35 (1953)
8. K. Lang, med. Wschr. Nr. 22, über Fettverdauung, 1953
9. Mahler, H. R., Wakil, S. J. und Bock, R. M., J. Biol. Chem. 204, 453 (1953)
10. Seubert, W. und Lynen, F., J. Amer. Chem. Soc. 75, 2787 (1953)
11. Stern, J. R., Del Campillo, A. und Lehninger, A. L., J. Amer. Chem. Soc. 77, 1073 (1955)
12. Schönheimer, R. und Rittenberg, D., J. Biol. Chem. 114 (1936)
13. Leloir, L. F. und Munoz, J. M., Biochem. J. 33, 734 (1939) und 147, 355 (1942)
14. Green, D. E., Biol. Rev. 29, 330 (1954)
15. Lehninger, A. L. und Kennedy, E. P., J. Biol. Chem. 179, 957 (1949)
16. Lipmann, F., Harvey Lect. 44, 99 (1948-49)
17. Emden, G. und Marx, A., Beitr. chem. Physiol. Pathol. 11, 318 (1908)
18. Jones, M. E., Black, S., Flynn, R. M. und Lipmann, F., Biochem. et Biophys. Acta 12, 141 (1953)
19. Green, D. E. in Biochem. Problems of Lipids, edited by G. Popjak und E. Lebreton, 233 (London 1956)
20. Dakin, H. D., Oxydations and reduktions in the animal body, Longmans, Green & Co., London (1912)
21. Stetten, D. jr., J. Am. Med. Ass., 150, 971 (1952)
22. Martius C., und F. Lynen, Adv. Enzymol. 10, 167 (1950)
23. Karlson P., Lehrbuch der Biochemie, XIV, Kapitel, 188-190
24. Brady, R. O., and S. Gurin, J. Biol. Chemie, Zschr. 199, 421 (1952)
25. Leuthard, F., Lehrbuch der Physiolog. Chemie, Berlin (1959)

26. Brand v. V., und E. Helmreich, Biochem. Zschr., 328, 146 (1956)
27. Entmann C., S. R. Lerner, I. L. Chaikoff und W. G. Dauben, Proc. Soc. Exp. Biol., (N. Y.) 70, 364 (1949)
28. Elsevier, Bd. 14, 1940, 194-196. H.: Roth.

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Professor Dr. W. Seitz in der Zeit von Januar 1961 bis August 1961 im Isotopenlabor der Universitätspoliklinik München ausgeführt.

Für die Stellung des Themas, sowie für die tatkräftige Unterstützung während der Durchführung der Arbeit möchte ich meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. W. Seitz herzlich danken.

Frau Dr. Dr. V. von Brandt, Leiterin des Isotopenlabors, möchte ich auf diesem Wege für Rat und Hilfe, die sie mir bei dieser Arbeit zuteil werden ließ, meinen Dank aussprechen.

Lebenslauf

Am 19. September 1937 wurde ich in Teheran/Iran geboren.
Dort besuchte ich von 1944 bis 1950 die Volksschule und anschließend das Gymnasium in Teheran. Im Juni 1956 legte ich die Reifeprüfung am Gymnasium in Teheran ab.

Im Wintersemester 1957/58 begann ich das Studium der Medizin an der Universität München und bestand dort im Sommersemester 1961 mein Physikum. Im Sommersemester 1962 fertigte ich im Isotopenlabor der Universitätspoliklinik München meine Doktorarbeit an.

Am 13. Februar 1964 legte ich mein Medizin-Staatsexamen ab.

Im August 1966 erlangte ich die ärztliche Approbation.